

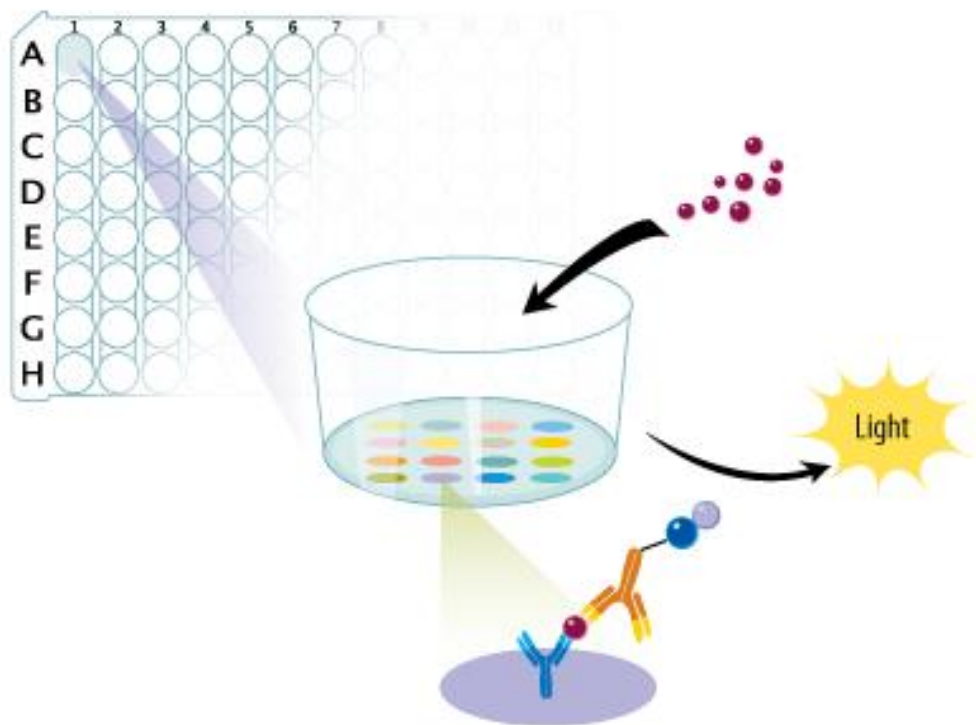


ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

Σχολή Μηχανολόγων Μηχανικών

Τομέας Μηχανολογικών Κατασκευών & Αυτομάτου Ελέγχου

Immunoenzymatic assay ELISA for creating standard titration curve of cytokine PAI1



Γρυπάρη Αγγελική: 02110623
Δημητροκάλλη Αγγελική: 02110087
Λιερός Ευάγγελος: 02112652
Μπατίχη Νάντερ: 02109690

Abstract

The purpose of this paper is to describe the procedure followed for creating a standard titration curve of cytokine PAI1. Four approximations of the curve were made, one by each member of the team, as a result of the immunoenzymatic assay Bead-Based Sandwich ELISA. The experimental results were statistically tested for their accuracy and the created curves can be used to determine the concentration of PAI1 in samples such as human serum for medical purposes.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	4
Εξοπλισμός / Υλικά	11
Περιγραφή Διαδικασίας	15
Αποτελέσματα	18
Σχολιασμός / Συμπεράσματα	20
Βιβλιογραφία	21

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ELISA

(Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay)

Η ELISA αποτελεί μια ανοσοενζυμική δοκιμασία της αναλυτικής βιοχημείας για την ανίχνευση της παρουσίας μίας ουσίας, κυρίως αντιγόνου ή αντισώματος, σε ένα δείγμα (συνήθως υγρό διάλυμα).

Η ELISA έχει χρησιμοποιηθεί ως ένα διαγνωστικό εργαλείο στην ιατρική και στην παθολογία των φυτών, καθώς και ως έλεγχος ποιότητας σε διάφορες βιομηχανίες.

Τα αντιγόνα του δείγματος συνήθως προσκολλώνται σε στερεή επιφάνεια και στη συνέχεια εφαρμόζεται ένα ειδικό αντίσωμα ώστε να προσδεθεί στο αντιγόνο. Αυτό το αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με ένα ένζυμο του οποίου το υπόστρωμα προστίθεται στο τελικό στάδιο της διαδικασίας. Η αντίδραση που ακολουθεί παράγει ένα ανιχνεύσιμο σήμα, συνήθως μία αλλαγή του χρώματος στο υπόστρωμα, το οποίο διαβάζεται από το κατάλληλο μηχάνημα και παρέχει πληροφορίες κυρίως ποιοτικές αλλά και ποσοτικές πληροφορίες για την παρουσία της ζητούμενης ουσίας στο δείγμα.

Είδη ELISA:

- **Απλή/Άμεση ELISA**

Περιλαμβάνει τη σύνδεση ενός αντιγόνου στην στερεή φάση, διαδικασία ακολοθούμενη από την προσθήκη ενός αντισώματος σημασμένου με κατάλληλο ένζυμο (βλ. υπεροξειδάση, αλκαλική φωσφατάση, βιοτίνη κ.ο.κ.).

Αρχικά, σε μια άμεση δοκιμή ELISA, η οποία θεωρείται να είναι ο απλούστερος τύπος ELISA, το αντιγόνο προσροφάται σε μια πλαστική πλάκα. Τότε προστίθεται περίσσεια μίας άλλης πρωτεΐνης για να δεσμεύσει το σύνολο των άλλων θέσεων συνδέσεως που δεν μας ενδιαφέρουν. Ενώ ένα ένζυμο συνδέεται με ένα αντίσωμα σε μια ξεχωριστή αντίδραση, το σύμπλοκο ενζύμου-αντισώματος εφαρμόζεται για να προσροφηθεί στο αντιγόνο. Αφού η περίσσεια συμπλόκου ενζύμου-αντισώματος ξεπλένεται, απομένει το ένζυμο-αντίσωμα συνδεδεμένο προς το αντιγόνο. Με την προσθήκη στο υπόστρωμα του ενζύμου, το ένζυμο ανιχνεύεται και απεικονίζει το σήμα του αντιγόνου.

Σημαντικό μειονέκτημα: Κάθε πρωτογενές αντίσωμα πρέπει να επισημαίνεται ατομικά, διαδικασία η οποία μπορεί να είναι χρονοβόρα κατά την εκτέλεση πολλαπλών πειραμάτων. Επίσης, το σήμα ενισχύεται λιγότερο σε άμεση ELISA, το οποίο σημαίνει μια χαμηλότερη ευαισθησία και θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα μειονέκτημα από μερικούς.

Σημαντικό πλεονέκτημα: Η διαδικασία σε αυτό το είδος ELISA είναι πολύ απλή και γρήγορη αφού απαιτεί μόνο ένα αντίσωμα και ολοκληρώνεται σε μία φάση προσθήκης ουσιών.

- **Έμμεση ELISA**

Περιλαμβάνει όπως και η άμεση την πρόσδεση του αντιγόνου σε στερεά φάση, αλλά σε αυτήν την περίπτωση, το πρωτογενές αντίσωμα δεν είναι επισημασμένο. Ένα δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ένζυμο, που κατευθύνεται κατά του πρώτου αντισώματος, προστίθεται στη συνέχεια. Αυτή η μορφή χρησιμοποιείται πιο συχνά για την ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων σε ορούς και εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με την άμεση ELISA.

Η έμμεση ELISA είναι μια δύο σταδίων ELISA, η οποία περιλαμβάνει δύο δεσμευτικές διαδικασίες του πρωτογενούς αντισώματος και του επισημασμένου δευτερογενούς αντισώματος. Το πρωτογενές αντίσωμα επώαζεται με το αντιγόνο και ακολουθεί η επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα.

Σημαντικό μειονέκτημα: Μπορεί να οδηγήσει σε μη ειδικά σήματα λόγω της διασταυρούμενης αντίδρασης που μπορεί να επιφέρει το δευτερεύον αντίσωμα.

Σημαντικά πλεονεκτήματα: Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία, καθώς περισσότερα από ένα σημασμένο αντίσωμα δεσμεύεται ανά μόριο αντιγόνου. Είναι πιο ευέλικτη μέθοδος από την προηγούμενη αφού διαφορετικά αντισώματα πρωτογενούς ανίχνευσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν με ένα μόνο επισημασμένο δευτερογενές αντίσωμα. Τέλος, έχει μεγάλη εξοικονόμηση κόστους, καθώς απαιτούνται λιγότερα σημασμένα αντισώματα.

- **Ανταγωνιστική ELISA**

Ο τρίτος τύπος ELISA είναι η ανταγωνιστική δοκιμασία, η οποία περιλαμβάνει την ταυτόχρονη προσθήκη των «ανταγωνιστών» αντισωμάτων ή πρωτεϊνών. Το σήμα που λαμβάνεται είναι αντιστρόφως ανάλογο της ποσότητας του προς ανίχνευση μορίου.

Βασικό ρόλο στην ανταγωνιστική ELISA έχει η ανταγωνιστική διαδικασία δέσμησης που εκτελείται από το αρχικό αντιγόνο (αντιγόνο δείγματος) και το προστιθέμενο αντιγόνο. Οι διαδικασίες της ανταγωνιστικής ELISA είναι αρκετά διαφορετικές σε σχέση με τα άλλα είδη ELISA.

Σημαντικό μειονέκτημα: Για ανταγωνιστική ELISA, όσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αντιγόνου του δείγματος, τόσο ασθενέστερη είναι το τελικό σήμα (άρα έχουμε μειωμένη ακρίβεια στα δείγματα με υψηλές συγκεντρώσεις).

Σημαντικά πλεονεκτήματα: Εμφανίζει υψηλή ακρίβεια, δεδομένου ότι χρησιμοποιούνται δύο αντισώματα για την δέσμηση και ανίχνευση της ζητούμενης ουσίας. Αυτό το είδος ELISA είναι κατάλληλο για περίπλοκα δείγματα, δεδομένου ότι το αντιγόνο δεν απαιτεί καθαρισμό πριν από τη μέτρηση. Τέλος παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία και ευαισθησία, δεδομένου ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο μέθοδοι: άμεσης και έμμεσης ανίχνευσης .

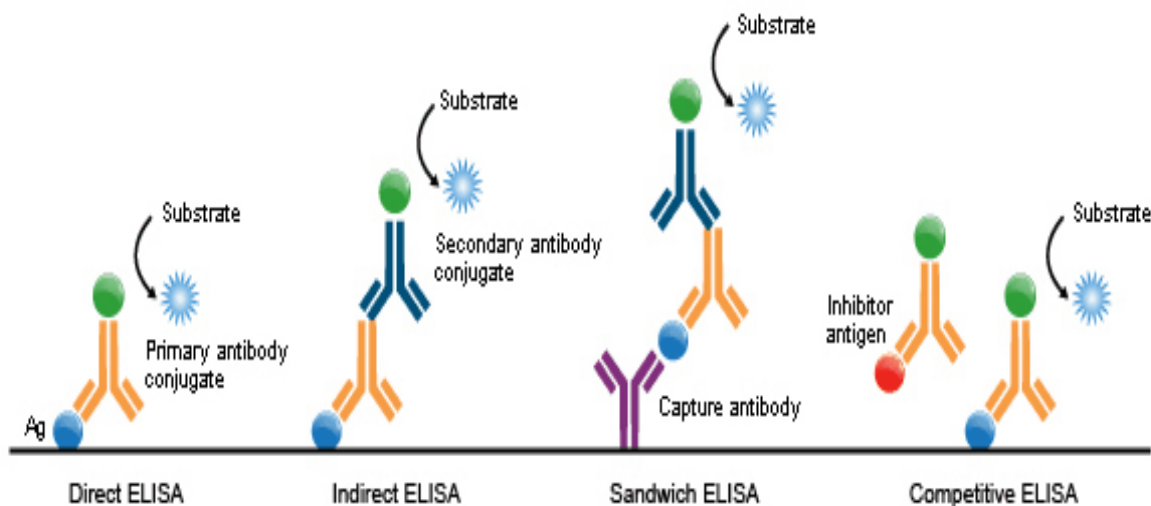
- **Sandwich ELISA**

Ο τελευταίος τύπος δοκιμασίας είναι η Sandwich ELISA και είναι η λιγότερο κοινή παραλλαγή της ELISA, αλλά είναι πολύ αποτελεσματική στην ανίχνευση αντιγόνου του δείγματος. Η Sandwich ELISA συνεπάγεται προσκόλληση των αντισωμάτων σύλληψης σε ένα υπόστρωμα στερεάς φάσης. Δείγματα που περιέχουν γνωστά ή άγνωστα αντιγόνα στη συνέχεια προστίθενται σε μία μήτρα ή σε ρυθμιστικό διάλυμα που θα ελαχιστοποιήσει την προσάρτηση στη στερεά φάση. Ένα αντίσωμα σημασμένο με ένζυμο προστίθεται στη συνέχεια για την ανίχνευση.

Η Sandwich ELISA πραγματοποιεί ποσοτικό προσδιορισμό αντιγόνων μεταξύ δύο στρωμάτων αντισωμάτων (δηλ. μεταξύ αντισώματος σύλληψης και αντισώματος ανίχνευσης). Το αντιγόνο που πρόκειται να μετρηθεί πρέπει να περιέχει τουλάχιστον δύο αντιγονικά επίτοπα ικανά για πρόσδεση με το αντίσωμα, αφού τουλάχιστον δύο αντισώματα δρουν στο σάντουιτς. Μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντισώματα σύλληψης και ανίχνευσης σε συστήματα Sandwich ELISA. Τα μονόκλωνα αντισώματα αναγνωρίζουν ένα μόνο επίτοπο που επιτρέπει έτσι την λεπτή ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των μικρών διαφορών σε ένα αντιγόνο, ενώ ένα πολυκλωνικό αντίσωμα χρησιμοποιείται συχνά ως το αντίσωμα σύλληψης για να τραβήξει προς τα κάτω τόσο του αντιγόνου όσο το δυνατόν.

Σημαντικό μειονέκτημα: Οι διαδικασίες Sandwich ELISA μπορεί να είναι δύσκολο να βελτιστοποιηθούν και θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα ζεύγος ελεγμένων αντισωμάτων. Αυτό εξασφαλίζει ότι τα αντισώματα ανίχνευσης θα έχουν διαφορετικούς επιτόπους επί της πρωτεΐνης-στόχου έτσι ώστε να μην αλληλεπιδρούν με το άλλο αντίσωμα.

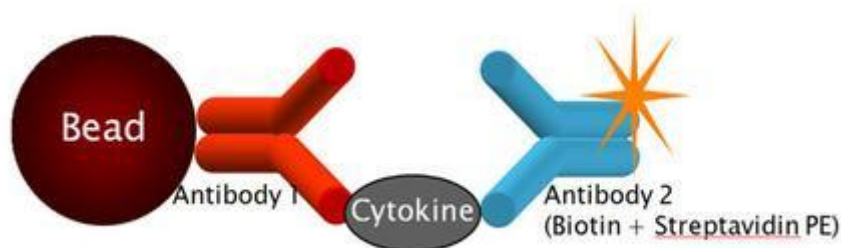
Σημαντικά πλεονεκτήματα: Παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία, καθώς περισσότερα από ένα σημασμένο αντίσωμα δεσμεύεται ανά μόριο αντιγόνου. Αυτό το είδος ELISA είναι κατάλληλο για περίπλοκα δείγματα, δεδομένου ότι το αντιγόνο δεν απαιτεί καθαρισμό πριν από τη μέτρηση. Τέλος και σε αυτό το είδος μπορούν να χρησιμοποιηθούν δύο μέθοδοι: άμεσης και έμμεσης ανίχνευσης .



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση των δοκιμασιών
www.abnova.com

➤ **Bead-Based Sandwich ELISA**

Αποτελεί παραλλαγή της Sandwich Elisa με παρόμοιο πρωτόκολλο ανοσοπροσδιορισμού. Η διαφορά έγκειται στην χρήση μικροσφαιριδίων για την προσκόλληση των αντισωμάτων αντί του υποστρώματος της Sandwich Elisa. Τα μικροσφαιρίδια αυτά είναι μαγνητικά και επιτρέπουν την αυτοματοποίηση των διεργασιών πλυσίματος και την κατασκευή πλήρως αυτοματοποιημένων αναλυτών. Ωστόσο, παρά τα πλεονεκτήματα που προσφέρει, η μέθοδος αυτή, για ανοσοδοκιμασίες, οι διατάξεις με μικροσφαιρίδια είναι ευνοϊκές μόνο για την ταυτόχρονη ανάλυση μικρού πλήθους στόχων αν και γίνονται συνεχώς προσπάθειες για βελτίωση των συνθηκών και αύξηση της πολυπλεκτικότητας της μεθόδου. Κυρίως η εταιρεία LUMINEX έχει αναπτύξει τεχνολογίες για τέτοιου τύπου δοκιμασίες αλλά έχει παραχωρήσει την άδεια σε πολλές άλλες εταιρείες για την χρήση και ανάπτυξη αυτών. Πολλές μελέτες έχουν συγκρίνει τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των δοκιμασιών LUMINEX με τις συμβατικές μεθόδους ELISA, ειδικά στο επίπεδο των προσδιορισμό κυτοκινών (που αποτελούν και αντικείμενο αυτής της έρευνας). Παρά τις, επί των πλείστων, κοινές συσχετίσεις, είναι σημαντικό να αναφερθεί η ασυμφωνία των ποσοτικών αποτελεσμάτων. Εν γένει, όμως, κατά την σύγκριση πανομοιότυπων αντιδραστηρίων (αντισωμάτων, διαλυμάτων αραιώσης κτλ.) είναι επιτεύξιμα παρόμοια αποτελέσματα.



Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του συμπλέγματος που σχηματίζεται κατά την δοκιμασία της bead – based sandwich ELISA
www.yslbio.com

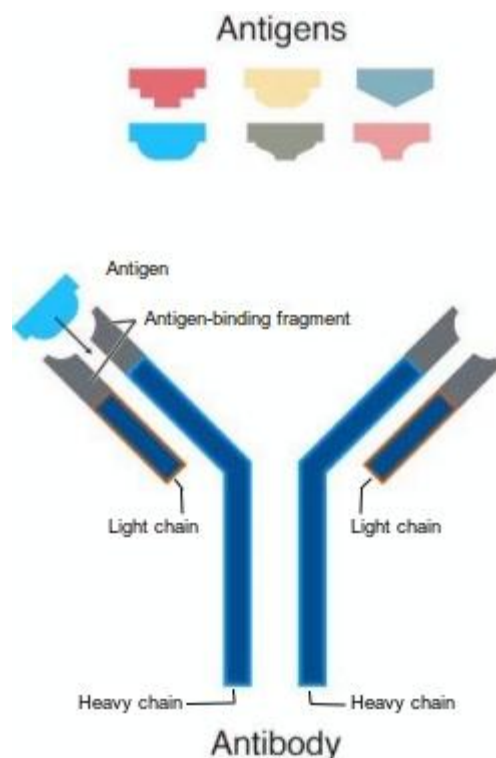
Ορολογία:

Αντιγόνο

Ένας πρωτεϊνικός ή ολιγοσακχαριδικός δείκτης που βρίσκεται στην επιφάνεια των κυττάρων με βάση τον οποίο αναγνωρίζεται το κύτταρο σαν ενδογενές ή εξωγενές αναγνωρίζεται η προέλευση του κυττάρου π.χ. δέρμα, νεφροί· ενεργοποιείται η παραγωγή αντισωμάτων, από τα Β λεμφοκύτταρα, τα οποία απενεργοποιούν ή καταστρέφουν το κύτταρο εάν είναι αναγκαίο· και ενεργοποιούν την κυτταροτοξική αντίδραση των κοκκιοκυττάρων, των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων. Τα αντιγόνα που βρίσκονται στην επιφάνεια των κυττάρων του οργανισμού ονομάζονται αυτοαντιγόνα. Τα αντιγόνα που βρίσκονται σε όλα τα άλλα κύτταρα ονομάζονται ξένα αντιγόνα. Η ταύτιση αρκετών τύπων ιστικών αντιγόνων είναι σημαντικό για την επιτυχή μεταμόσχευση κάποιου οργάνου. Φλεγμονή προκαλείται όταν τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα εντοπίσουν κάποιο αντιγόνο οποιασδήποτε προέλευσης σε περίπτωση κάποιου τραυματισμού του σώματος. Το αντιγόνο μπορεί να είναι ξένο ή αυτοαντιγόνο, το οποίο έχει υποστεί κάποια εκφύλιση και για το λόγο αυτό αναγνωρίζεται σαν ξένο. Η αντίδραση των Β και Τ λεμφοκυττάρων σε κάποιο αντιγόνο αποτελεί τμήμα της ειδικής ανοσολογικής απάντησης. Υπάρχουν ακόμη αντιγόνα μικροβιακής προέλευσης αλλά και αντιγόνα που προέρχονται από τα τρόφιμα, την γύρη και άλλους φυσικούς παράγοντες.

Αντίσωμα

Μια ουσία σχήματος Υ, η οποία παράγεται από τα Β λεμφοκύτταρα σε απάντηση ενός και μοναδικού αντιγόνου. Κάθε μόριο Ab συνδέεται με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο για να το ελέγξει ή να το καταστρέψει. Όλα τα αντισώματα, παράγονται από τα Β λεμφοκύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούνται από εξωγενή αντιγόνα, τα οποία κατά κανόνα είναι πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες ή νουκλεϊνικά οξέα.



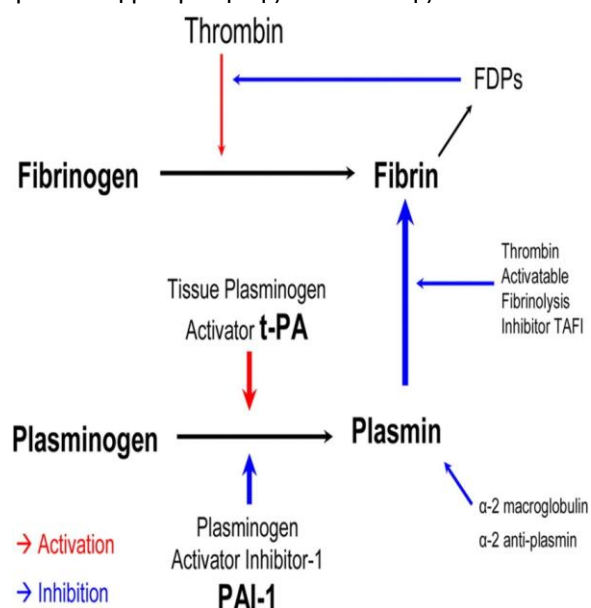
Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της δομής του αντισώματος
biology.about.com

Κυτοκίνες

Αποτελούν μια ομάδα με περισσότερες από 100 διακριτές πρωτεΐνες οι οποίες παράγονται πρωτογενώς από τα λευκά αιμοσφαίρια. Παρέχουν μηνύματα για να ρυθμίσουν ανοσολογικά θέματα της κυτταρικής αύξησης και λειτουργίες κατά τη διάρκεια τόσο της φλεγμονής όσο και ειδικών ανοσολογικών αντιδράσεων. Κάθε κυτοκίνη εκκρίνεται από ένα ειδικό κύτταρο ως αντίδραση έναντι ειδικού ερεθίσματος. Οι κυτοκίνες οι οποίες παράγονται από μονοκύτταρα ή μακροφάγα και λεμφοκύτταρα, ονομάζονται μονοκίνες και λεμφοκίνες αντίστοιχα. Οι κυτοκίνες περιλαμβάνουν τις ιντερλευκίνες, τις ιντερφερόνες, τους παράγοντες νέκρωσης όγκων, την ερυθροποιητίνη και τους παράγοντες διέγερσης αποικιών. Δρουν αλλάζοντας τα κύτταρα τα οποία τις παράγουν (αυτοκρινής δράση) και μεταβάλλοντας άλλα κύτταρα κοντά στα προηγούμενα (παρακρινής δράση). Ορισμένες επηρεάζουν κυτταρικά συστηματικά (ενδοκρινής δράση).

➤ PAI-1

Ο αναστολέας ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου 1 (PAI-1) αντιγόνο είναι μία γλυκοπρωτεΐνη απλής αλυσίδας (MB 50.000) που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα ηπατοκύτταρα και βρίσκεται επίσης στα άλφα κοκκία των αιμοπεταλίων. Ο PAI-1 είναι ένας αναστολέας της πρωτεΐνης σερίνης που εκκρίνεται ως απόκριση σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Τα άλφα κοκκία των αιμοπεταλίων περιέχουν μεγάλες ποσότητες του PAI-1, οι οποίες απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της αγγειακής βλάβης και βοηθούν στην σταθεροποίηση των ινωδών θρόμβων. Ο PAI-1 συντίθεται σε δραστική μορφή, αλλά έχει έντονη λειτουργική αστάθεια και ένα λειτουργικό χρόνο ζωής περίπου 2 ώρες in vivo. Ο κυκλοφορών PAI-1 δεσμεύεται από τη βιτρονεκτίνη, η οποία προστατεύει τον αναστολέα από την αδρανοποίηση και μπορεί να βοηθήσει στη στόχευση του σε θέσεις αγγειακής βλάβης. Τουλάχιστον 4 διαφορετικές διαμορφώσεις του PAI-1 έχουν περιγραφεί: α) η δραστική μορφή η οποία αντιδρά με ενεργοποιητή πλασμινογόνου, β) μία λανθάνουσα μορφή η οποία δεν αντιδρά, γ) ένα έντυπο υπόστρωμα που μπορεί να διασπαστεί με ενεργοποιητές πλασμινογόνου, αλλά είναι μη ανασταλτικό, και δ) η αδρανής μορφή του PAI-1 που παράγεται από την διάσπαση της αντιδρούσας. Ο PAI-1 είναι ο κύριος αναστολέας του ιστού ενεργοποιητή πλασμινογόνου (tPA) και του ενεργοποιητή πλασμινογόνου ουροκινάσης (uPA), και ως εκ τούτου, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ινωδολύσης.



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση του δικτύου στο οποίο συμμετέχει η PAI1
[Laboratory of tubor and development biology](#)

Για ποιο λόγο μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε την κυτοκίνη PAI1?

Αυξημένα επίπεδα του PAI-1 έχουν ως αποτέλεσμα ανεπαρκή ενεργοποίηση του πλασμινογόνου και συνδέεται με μια προδιάθεση για θρόμβωση, συμπεριλαμβανομένης της φλεβο-αποφρακτικής νόσου (VOD) μετά από μεταμόσχευση μυελού των οστών (BMT).

Η οικογενής θρόμβωση έχει συσχετιστεί με κληρονομικώς αυξημένα επίπεδα του PAI-1. Αυξημένα επίπεδα του PAI-1 έχουν επίσης αναφερθεί σε έναν αριθμό καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένων κακοήθειας, ηπατικής νόσου, της μετεγχειρητικής περιόδου, σηπτικού σοκ, το δεύτερο και το τρίτο τρίμηνο της κύησης, της παχυσαρκίας, και της στεφανιαίας νόσου.

Τα χαμηλά επίπεδα της δραστηρικής μορφής του PAI-1 έχουν συσχετισθεί με κλινικά σημαντική αιμορραγία. Πλήρης ανεπάρκεια του PAI-1, είτε εκ γενετής είτε επίκτητη, συνδέεται με αιμορραγικές εκδηλώσεις που περιλαμβάνουν αιματώματα, μηνορραγία, έντονο σχηματισμό μωλώπων, και μετεγχειρητική αιμορραγία.

Οι τιμές αναφοράς του PAI-1 είναι 3-72 ng / mL. Τα αυξημένα επίπεδα του αναστολέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου τύπου 1 (PAI-1) που συνδέεται με μια προδιάθεση για θρόμβωση. Μειωμένα ή απύεστα επίπεδα ανιχνεύσιμα λειτουργικής PAI-1 θα οδηγήσει σε μια ισόβια αιμορραγική διάθεση.

Assay Buffer

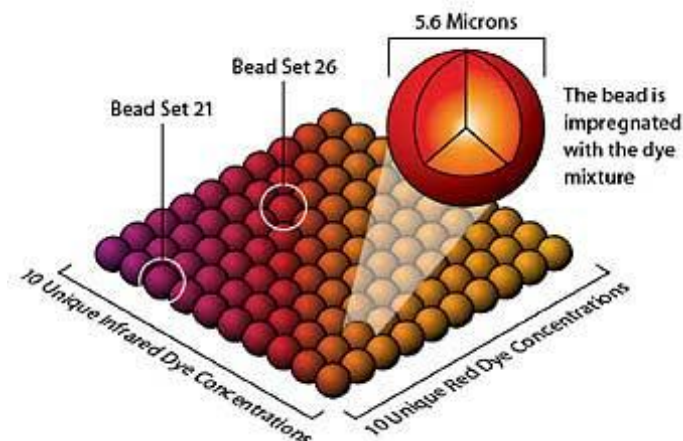
Πρόκειται για διαλύτη ο οποίος χρησιμοποιείται σε μεθόδους ανίχνευσης όπως είναι η ELISA, η Western blot και η ανοσοϊστοχημεία (IHC) κ.ά. και ρυθμίζει την δέσμευση των πρωτεϊνών αποκλείοντας τις περισσευούμενες θέσεις δέσμευσης. Συχνός ρυθμιστής είναι το BSA (διαλυμένος σε PBS) και τα ρυθμιστικά του διαλύματα συχνότερα αραιώνονται σε 1% BSA για την αρχική δοκιμή για να είναι επωφελή για συγκεκριμένα συστήματα. Ο ρυθμιστής BSA είναι συνήθως πιο αποτελεσματικός από άλλους επειδή περιέχει μία μόνο καθαρισμένη πρωτεΐνη που στερείται ενδογενή βιοτίνη.



Εικόνα 5: Ρυθμιστής BSA
www.piercenet.com

Beads

Εσωτερικά χρωματισμένα μικροσφαιρίδια διαμέτρου 5.6μm. Χρησιμοποιούνται στη δοκιμασία bead-based sandwich ELISA ως επιφάνεια πρόσδεσης του πρώτου αντισώματος (capture antibody). Τα μικροσφαιρίδια είναι βαμμένα με δύο είδη βαφών (ερυθρή και υπέρυθρη) σε διάφορες συγκεντρώσεις δημιουργώντας έτσι έως και 100 ξεχωριστές κατηγορίες. Κάθε κατηγορία είναι συζευγμένη με ένα συγκεκριμένο στόχο ανάλυσης.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των μικροσφαιριδίων (beads).

www.viracorbit.com

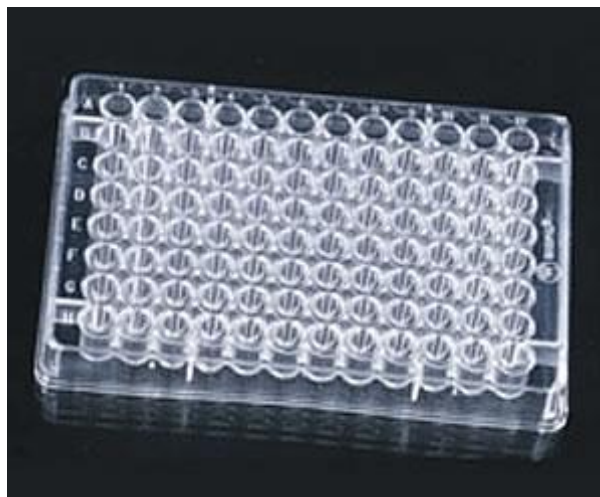
SAPE

Στρεπταβιδίνη φυκοερυθρίνης, επίσης γνωστή ως SA-PE ή K-PE στρεπταβιδίνη, χρησιμοποιείται τυπικά για κυτταρομετρία ροής, μικροσυστοιχίες, ELISA, και άλλες εφαρμογές που απαιτούν είτε υψηλή ευαισθησία είτε ταυτόχρονη πολύχρωμη ανίχνευση. Η φυκοερυθρίνη είναι μέλος μιας οικογένειας πρωτεϊνών που ονομάζονται φυκοβιλυπρωτεΐνες, οι οποίες προέρχονται από κυανοβακτήρια και ευκαρυωτικά φύκη και εμφανίζουν εξαιρετικά φωτεινό φθορισμό και υψηλές αποδόσεις κβάντων.

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ/ΥΛΙΚΑ

Πλάκα multiwell

Μια πλάκα μικροτιτλοδότησης (multiwell) είναι μια επίπεδη πλάκα με πολλαπλά « πηγάδια » που χρησιμοποιούνται ως μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες. Η πλάκα multiwell έχει γίνει ένα πρότυπο εργαλείο στην αναλυτική έρευνα και κλινικές εργαστηριακές διαγνωστικές εξετάσεις . Μια πολύ κοινή χρήση είναι η ανοσοενζυμική δοκιμασία (ELISA), η βάση της πλέον σύγχρονης ιατρικής για διαγνωστικές δοκιμές σε ανθρώπους και ζώα.



Εικόνα 7: Πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 θέσεων
www.membrane-solutions.com

Πιπέτα

Η πιπέτα αποτελεί ένα εργαστηριακό εργαλείο που χρησιμοποιείται για την ακριβή μέτρηση και μεταφορά όγκου υγρού.



Εικόνα 8: Πιπέτες για την μεταφορά διαφορετικού όγκου υγρού
labnetinternational.com

Vortex mixer

Ένα vortex μίξερ ή απλώς vortex είναι μια απλή συσκευή που χρησιμοποιείται συνήθως σε εργαστήρια για να αναμειγνύονται υγρά σε μικρά φιαλίδια. Αποτελείται από έναν ηλεκτρικό κινητήρα με τον κινητήριο άξονα προσανατολισμένο κάθετα και συνδέεται με ένα κοίλο τεμάχιο από καουτσούκ τοποθετημένα ελαφρώς έκκεντρα. Καθώς ο κινητήρας λειτουργεί το πλαστικό τμήμα ταλαντώνεται ταχέως κυκλικά. Όταν ένας δοκιμαστικός σωλήνας ή άλλο κατάλληλο δοχείο πιέζεται μέσα στο κύπελλο από καουτσούκ (ή αγγίζει το άκρο του), η κίνηση μεταδίδεται στο υγρό δημιουργώντας μία δίνη. Τα περισσότερα vortex έχουν μεταβλητή ρύθμιση ταχύτητας και μπορούν να ρυθμιστούν είτε να είναι σε συνεχή λειτουργία ή να ενεργοποιούνται μόνο όταν το κύπελλο από καουτσούκ δέχεται καθοδική πίεση.



Εικόνα 9: μίξερ vortex για ανάμειξη των διαλυμάτων

www.keison.co.uk

Eppendorf tubes

Οι πλαστικοί σωλήνες erppendorf διαφόρων χωρητικότητων χυτεύονται από ένα εύκαμπτο διαφανές πλαστικό παρόμοιο με το πολυαιθυλένιο. Είναι ημί-κωνικού σχήματος με ενσωματωμένα αρθρωτά πώματα σφραγίσεως και χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία μειγμάτων.



Εικόνα 10 : Σωλήνας Eppendorf

www.nature.com

Αναδευτήρας (shaker)

Ένας τυπικός αναδευτήρας αποτελείται από μία οριζόντια τράπεζα που ταλαντώνεται και τροφοδοτείται από έναν ηλεκτρικό κινητήρα. Τα υγρά που αναδεύονται διατηρούνται σε κύπελλα, φιάλες βάζα ή φιάλες Erlenmeyer που τοποθετούνται πάνω στην τράπεζα ή, μερικές φορές, σε δοκιμαστικούς σωλήνες ή φιαλίδια τα οποία είναι ένθετα σε οπές στην πλάκα. Υπάρχουν επίσης περιστροφικοί αναδευτήρες, που ανακινούν το δοχείο με κυκλικό τρόπο.



Εικόνα 11 : Αναδευτήρας

www.kentscientific.com

Λουτρό υπερήχων (ultrasonic bath)

Τα λουτρά υπερήχων αποτελούνται από μεγάλες δεξαμενές και μετατροπείς υπερήχων που παράγουν υψηλής έντασης υπέρηχους σε όλη την ταλαντευόμενη δεξαμενή.



Εικόνα 12: Λουτρό υπερήχων

www.keison.co.uk

Μαγνήτης

Μαγνητική πλάκα με λαβές συγκράτησης όπου προσαρμόζεται η πλάκα multiwell κατά τη διαδικασία των ξεπλυμάτων ώστε να συγκρατούνται τα μαγνητικά σφαιρίδια (beads).



Εικόνα 13: Μαγνήτης

www.biotek.com

Luminex

Το μηχάνημα Luminex εντοπίζει τα αντιγόνα ή τα αντισώματα στο προς εξέταση δείγμα. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της μέτρησης της έντασης φθορισμού που εκπέμπεται από κάθε well και αποτελεί το τελικό του Multiplexassay, μίας κατηγορίας δοκιμών στην οποία περιλαμβάνεται και το πείραμα που εκτελέσαμε.



Εικόνα 14: Συσκευή LUMINEX που επιτρέπει την εκτέλεση πολυπλεκτικών πρωτόκολλων

www.luminex.corp

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για την ανοσοενζυμική δοκιμασία Elisa ακολουθήθηκε το καθορισμένο πρωτόκολλο της δοκιμασίας με τους αντίστοιχους υπολογισμούς όπως που παρουσιάζονται παρακάτω βηματικά.

1. Αρχικά κάνουμε καλό vortex (3-4 sec) και sonication (10 sec) το capture αντίσωμα που θα χρησιμοποιήσουμε. Κάνουμε vortex και σε όλα τα διαλύματα πριν τα χρησιμοποιήσουμε είτε τα έχουμε παράξει εμείς είτε είναι από stock (αυτό εννοείται και παραλείπεται από τα παρακάτω βήματα).
2. Χρειαζόμαστε 50μl capture/well και 2500 beads/ region/ well. Οι υπολογισμοί μας έχουν ως εξής:
 - αριθμός wells ανά άτομο * συντελεστής ασφαλείας * $\frac{\text{ζητούμενος αριθμός beads/region}}{\text{stock beads/ml}}$ = A
 $8 * 1,2 * \frac{2500}{5000} = 4,8 \mu\text{l capture} = A$
 - αριθμός wells ανά άτομο * συντελεστής ασφαλείας * ποσότητα (capture/well) = B
 $8 * 1,2 * 50 = 480 \mu\text{l συνολικού διαλύματος} = B$
 - B - A = 475,2 μl Assay Buffer (PBS 1% BSA)
3. Βάζουμε 50 μl από το παραπάνω μείγμα που παρασκευάσαμε σε κάθε well που πρόκειται να χρησιμοποιήσουμε.
4. Βάζουμε την πλάκα πάνω στον μαγνήτη, περιμένουμε 1 λεπτό και πετάμε το υπερκείμενο.
5. Αφαιρούμε τον μαγνήτη, προσθέτουμε 100 μl Assay Buffer, βάζουμε την πλάκα πάνω στον μαγνήτη, περιμένουμε 1 λεπτό και πετάμε το υπερκείμενο. Αφαιρούμε τον μαγνήτη.
6. Θέλουμε να προσθέσουμε 50 μl δείγματος πρωτεΐνης/ well με δοσμένο stock 1000ng/ml . Θέλουμε ακόμη να ξεκινήσουμε από αρχική ποσότητα πρωτεΐνης 100ng/well . Οι υπολογισμοί μας είναι οι ακόλουθοι:
 - αρχική ποσότητα πρωτεΐνης / μείγμα well = συγκέντρωση πρωτεΐνης στο well
 $400 / 50 = 8 \text{ ng/}\mu\text{l}$ τελική συγκέντρωση
 - μείγμα well * αρχικό well * 2 (παίρνω το διπλάσιο για να γίνουν οι διαδοχικές αραιώσεις με το υπόλοιπο μισό) * συντελεστής ασφαλείας = ποσότητα διαλύματος:
 $50 * 1 * 2 * 1,2 = 120 \mu\text{l}$ διαλύματος
 - $V_{\text{αρχ}} = 0,96 \mu\text{l}$ από το αρχικό διάλυμα πρωτεΐνης σε $120 - 0,96 = 119,04 \mu\text{l}$ Assay Buffer
7. Από αυτό το διάλυμα παίρνουμε 60 μl και τα τοποθετούμε σε ένα erpendorf μαζί με 60 μl Assay Buffer οπότε απευθείας μειώνω την συγκέντρωση στο μισό.
8. Αυτό το βήμα το επαναλαμβάνουμε άλλες 5 φορές για να πάρουμε τις διαδοχικές αραιώσεις μας.
9. Τοποθετούμε 50 μl δείγματος/ well .
10. Σκεπάζουμε την πλάκα με ειδική μεμβράνη και την αφήνουμε να επωαστεί για 1,5 ώρα στο shaker σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Βάζουμε την πλάκα πάνω στον μαγνήτη, περιμένουμε 1 λεπτό και πετάμε το υπερκείμενο.

12. Αφαιρούμε τον μαγνήτη, προσθέτουμε 100 μl Assay Buffer, βάζουμε την πλάκα πάνω στον μαγνήτη, περιμένουμε 1 λεπτό και πετάμε το υπερκείμενο. Επαναλαμβάνουμε αυτό το βήμα 2 φορές συνολικά. Αφαιρούμε τον μαγνήτη.
13. Τοποθετούμε 20 μl/ well detection αντίσωμα σε αραιώση 1:400.
14. Σκεπάζουμε την πλάκα με ειδική μεμβράνη την αφήνουμε να επωαστεί για 1 ώρα στο shaker σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Προσθέτουμε 100 μl Assay Buffer, βάζουμε την πλάκα πάνω στον μαγνήτη, περιμένουμε 1 λεπτό και πετάμε το υπερκείμενο (χωρίς να απορρίψουμε προηγουμένως το detection όπως κάναμε σε προηγούμενο βήμα).
16. Αφαιρούμε τον μαγνήτη, προσθέτουμε 100 μl Assay Buffer, βάζουμε την πλάκα πάνω στον μαγνήτη, περιμένουμε 1 λεπτό και πετάμε το υπερκείμενο. Αφαιρούμε τον μαγνήτη.
17. Αραιώνουμε με διάλυμα SAPE σε 50 μl/ well . Η επιθυμητή αραιώση είναι 1: 400, άρα υπολογίζουμε:
 - συνολικός αριθμός wells ανά άτομο * συντελεστής ασφαλείας * διάλυμα SAPE = ποσότητα διαλύματος:
 $8 * 1,2 * 50 = 480$ μl διαλύματος
 - ποσότητα διαλύματος / αραιώση = ποσότητα SAPE
 $480 / 400 = 1,2$ μl SAPE σε $480 - 1,2 = 478,9 \approx 479$ μl Assay Buffer
18. Γίνεται επώαση για 15 λεπτά.
19. Βάζουμε την πλάκα πάνω στον μαγνήτη, περιμένουμε 1 λεπτό και πετάμε το υπερκείμενο.
20. Αφαιρούμε τον μαγνήτη, προσθέτουμε 100 μl Assay Buffer, βάζουμε την πλάκα πάνω στον μαγνήτη, περιμένουμε 1 λεπτό και πετάμε το υπερκείμενο.
21. Αφαιρούμε τον μαγνήτη και επαναδιαλύουμε σε 130 Assay Buffer. Κάνουμε ανακίνηση για 1 λεπτό στο shaker και τοποθετούμε την πλάκα μέσα στο μηχάνημα της LUMINEX.
22. Μετά από περίπου 40- 50 λεπτά παίρνουμε τις μετρήσεις από το μηχάνημα.

Παρακάτω παρατίθεται το κείμενο του πρωτοκόλλου για την διαδικασία της Bead Based Sandwich Elisa στα αγγλικά όπως παραχωρήθηκε από την LUMINEX (τα βήματα παρουσιάζονται περισσότερα λόγω της συνοπτικής παρουσίασης που κάναμε στα βήματα των πλύσεων, δηλαδή περιγραφή των σταδίων πλύσεων σε ένα βήμα) :

1. Resuspend the selected antibody-coupled microsphere sets (vortex and sonication for 10 seconds).
2. Mix coupled microspheres (stock concentration 5000 microspheres/ul) to a final concentration of 50 microspheres of each set/ul using as diluent Assay buffer (PBS, BSA 1%).
3. Mix biotinylated detection antibodies using as diluent Assay buffer (20ul of the detection antibody mix are needed for the sandwich ELISA reaction at step 14). The volume of each detection antibody needed for the reaction is different for each detection Ab and has been optimized.
4. Transfer 50ul of the microsphere mixture into each well of a flat bottom 96-well plate.
- 5 . Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.

- 6 . Add 100ul/well assay buffer.
7. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
8. Transfer 50ul of the sample or standard into the appropriate wells.
9. Cover plate with a plate sealer and shake it at maximum speed (800 rpm) for 90 minutes at room temperature.
10. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
11. Add 100ul/well assay buffer.
12. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
13. Repeat steps 10-11.
14. Transfer 20ul of the detection antibody mix into each well of the plate.
15. Cover plate with a plate sealer and shake it at maximum speed (800 rpm) for 90 minutes at room temperature.
16. Place the plate on the magnetic separator, add 100ul/well assay buffer and discard supernatant.
17. Add 100ul/well assay buffer.
18. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
19. Prepare the PE mix, diluting 1:200 the stock (1mg/ml) SAPE into assay buffer. Make enough in order to add 50ul per well.
20. Add the freshly prepared, photophobic (!) PE mix (50ul/well).
21. Cover plate with a plate sealer and shake it at maximum speed (800 rpm) for 15 minutes at room temperature.
22. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
23. Add 100ul/well assay buffer.
24. Place the plate on the magnetic separator, wait for 1 minute and discard supernatant.
25. Remove the plate from the magnetic separator and resuspend the microspheres in 130ul/well assay buffer.
26. Cover plate with a plate sealer and shake it at maximum speed (800 rpm) for 1 minute at room temperature.
27. Remove the plate sealer, place the plate in the Luminex instrument for measurement.
28. Analyze 100ul in the Luminex instrument according to the system manual.

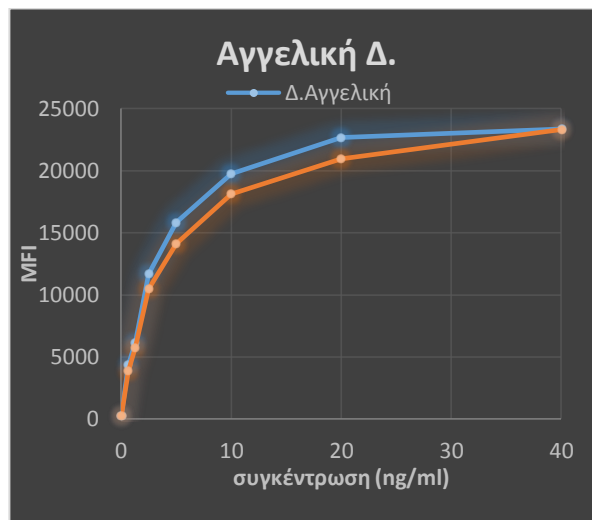
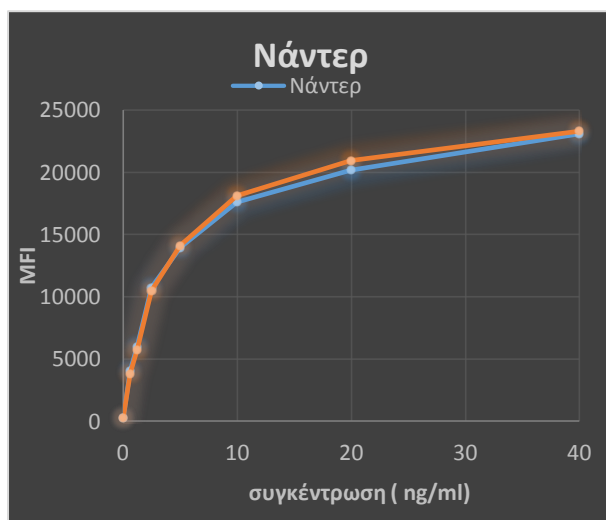
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

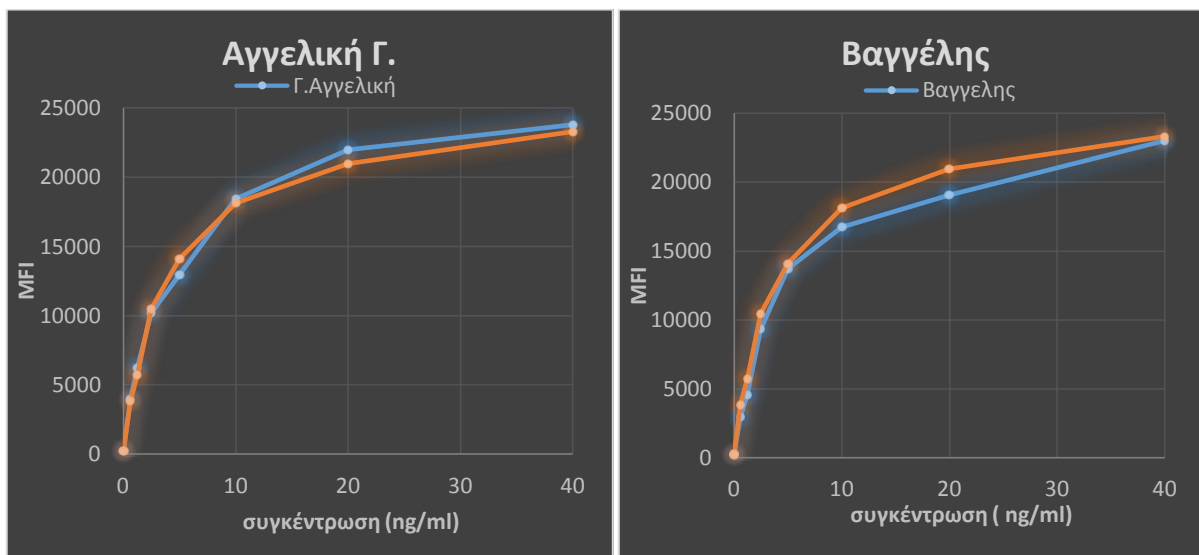
Ακολουθούν τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων μας από τη συσκευή της LUMINEX. Η συσκευή υπολογίζει το FI (FluorescenceIntensity) δηλαδή την ένταση φθορισμού για κάθε μικροσφαιρίδιο που αναλύει και για κάθε well που εξετάζει και δίνει ως αποτέλεσμα το MFI (MedianFluorescenceIntensity) δηλαδή τη διάμεση τιμή της έντασης φθορισμού όλων των μικροσφαιριδίων.

Από αυτά τα δεδομένα και τις τιμές συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε ng/ml στα δείγματά μας προέκυψαν οι παρακάτω πίνακες και καμπύλες, για 7 διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος ανά well ανά άτομο καθώς και ένα well με μηδενικό σήμα ως control (στο οποίο δεν έχει προστεθεί καθόλου αντιγόνο). Επίσης, έχουν υπολογιστεί ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση και ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) των μετρήσεων μας.

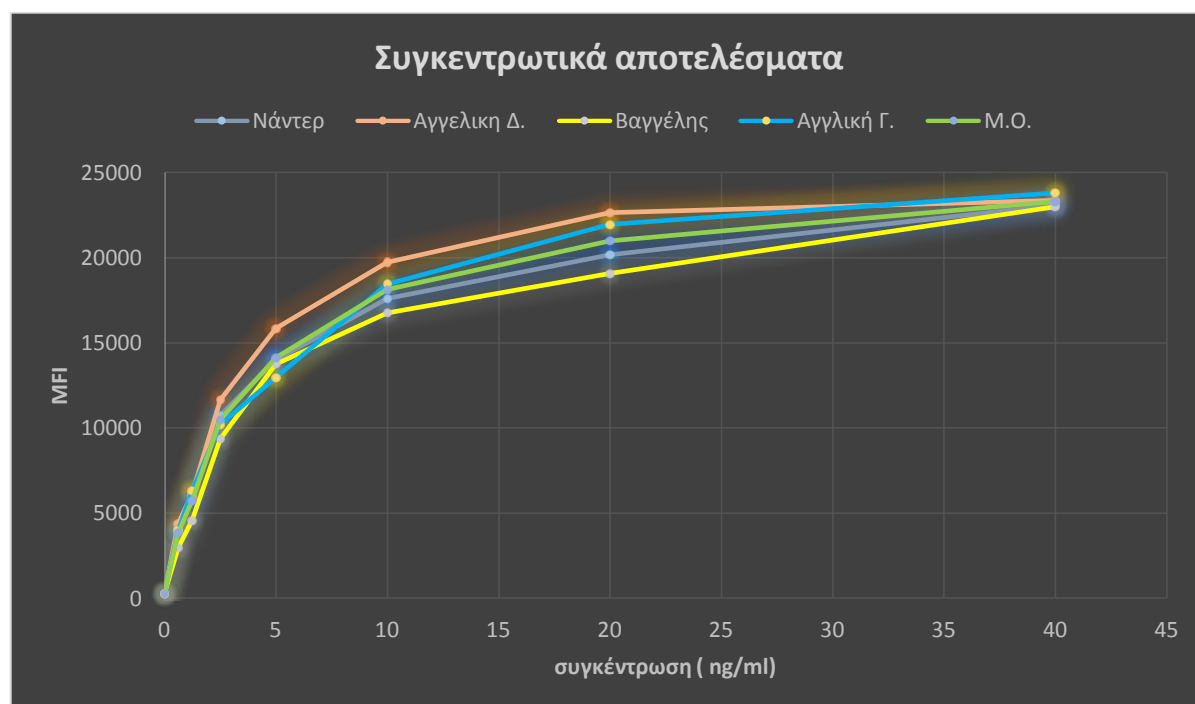
Συγκέντρωση (ng/ml)	Median Fluorescence Intensity						
	Νάντερ	Δ.Αγγελική	Γ.Αγγελική	Βαγγέλης	Μ.Ο.	Τυπική απόκλιση	CV
40	23099	23359	23798	22999,5	23313,88	356,57	0,015294
20	20175,5	22655,5	21967,5	19089	20971,88	1633,53	0,077892
10	17595	19740	18437	16759,5	18132,88	1271,59	0,070126
5	13985	15833,5	12974,5	13742,5	14133,88	1212,19	0,085765
2,5	10755	11662	10198	9349	10491	971,42	0,092595
1,25	5975,5	6126	6283,5	4582	5741,75	783,33	0,136426
0,625	4078,5	4377,5	3982,5	2978,5	3854,25	6,075,812	0,157639
0	261,5	275	256,5	245	259,5	124,298	0,047899

Οι καμπύλες που προκύπτουν για τις μετρήσεις καθενός συγκριτικά με τον μέσο όρο είναι:





Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα όλων των μελών συγκριτικά με τον μέσο όρο:



ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ / ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως ήταν αναμενόμενο υπάρχουν αποκλίσεις μεταξύ των πειραματικών αποτελεσμάτων του κάθε μέλους της ομάδας που πιθανά οφείλονται σε σφάλματα κατά τη διεξαγωγή της δοκιμής (ανακριβές πιπετάρισμα κ.α.). Πάραυτα, μπορούμε να πούμε ότι οι καμπύλες τιτλοδότησης της κυτοκίνης PAI-1 που προέκυψαν από αυτά τα δεδομένα αποτελούν καλή προσέγγιση της πραγματικής μόνο εάν οι αποκλίσεις των αποτελεσμάτων δεν είναι σημαντικές.

Αρχικά, παρατηρώντας τα παραπάνω γραφήματα μπορούμε να υποθέσουμε ότι τα αποτελέσματα των πειραματικών μας μετρήσεων αποτελούν ομοιογενές δείγμα, όπως μπορούμε να συμπεράνουμε και από τα μέτρα διασποράς που υπολογίστηκαν.

Για να επικυρώσουμε αυτή την υπόθεση πραγματοποιήθηκε στατιστικό τεστ ανάλυσης διακύμανσης (analysis of variance) ή ANOVA test. Το τεστ ANOVA αποτελεί μία επέκταση του t-test για 3 ή περισσότερα δείγματα (στην περίπτωσή μας 4). Έτσι ορίζουμε τη μηδενική υπόθεση, ότι δηλαδή τα δείγματά μας δεν διαφέρουν σημαντικά. Τα αποτελέσματα του τεστ φαίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

SUMMARY				
Groups	Count	Sum	Average	Variance
Αγγελική Γ.	8	97897,5	12237,19	74084870
Βαγγέλης	8	89745	11218,13	67666207
Αγγελική Δ.	8	104028,5	13003,56	77044148
Νάντερ	8	95925	11990,63	66236760

ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F _{crit}
Between Groups	12994396	3	4,00E+06	0,060786	0,97998	2,946
Within Groups	2,00E+09	28	7,00E+07			
Total	2,01E+09	31				

Κριτήριο ισχύος της μηδενικής υπόθεσης είναι η ικανοποίηση της ανισότητας : $F_{crit} > F$. Εδώ $2,946685 > 0,060786$, συνεπώς η μηδενική υπόθεση είναι αληθής και κατά συνέπεια επικυρώνεται και η αρχική παρατήρηση ότι δηλαδή τα δεδομένα που προέκυψαν από τις πειραματικές μας μετρήσεις δεν διαφέρουν σημαντικά. Μπορούμε λοιπόν να συμπεράνουμε ότι η πειραματική διαδικασία εκτελέστηκε αρκούντως σωστά από όλα τα μέλη της ομάδας.

Σε περίπτωση που θέλαμε να εντοπίσουμε την συγκέντρωση του παράγοντα PAI-1 σε δείγμα ανθρώπινου ορού η διαδικασία που θα ακολουθούσαμε θα ήταν η εξής : Υποβάλουμε το δείγμα σε δοκιμασία ELISA, όμοια με αυτή που εκτελέστηκε κατά τη διεξαγωγή του πειράματος. Μετά την ανάλυση του δείγματος από το μηχάνημα παίρνουμε μία τιμή από το MFI και βάσει αυτής και της καμπύλης τιτλοδότησης θα μπορούσαμε να προσδιορίσουμε σε τι συγκέντρωση αντιστοιχεί, δηλαδή ποια είναι η συγκέντρωση της κυτοκίνης PAI-1 στο υπό εξέταση δείγμα ανθρώπινου ορού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

biology.about.com

labnetinternational.com

www.abnova.com

www.biotek.com

www.elisa-antibody.com

www.ifcc.org

www.keison.co.uk

www.kentscientific.com

www.lbtd.ulq.ac.be

www.luminexcorp.com

www.mayomedicallaboratories.com

www.membrane-solutions.com

www.nature.com

www.piercenet.com

www.sdstate.edu

www.viracorbit.com

www.yslbio.com